

1767.2011-005

89

BIOABSORBABLE DRUG CARRIER

Patent Number: JP2000239305
Publication date: 2000-09-05
Inventor(s): IKETANI HITOSHI; ARAI KAZUHIKO
Applicant(s): DENKI KAGAKU KOGYO KK
Requested Patent: ☐ JP2000239305
Application Number: JP19990043287 19990222
Priority Number(s):
IPC Classification: C08B37/08
EC Classification:
Equivalents:

Abstract

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain the subject base material by admixing a gel formed with hyaluronic acid only that is slightly soluble in neutral aqueous solution where the base material has excellent safety and biocompatibility, because any crosslinking agent is not used and is useful as a drug carrier for injection, inhalation, implant and oral administration or the like.

SOLUTION: This bioabsorbable drug-carrying material includes the gel that is formed from only hyaluronic acid slightly soluble in a neutral aqueous solution. This gel has a dissolution rate of $\leq 50\%$ in 12 hours in a neutral aqueous solution at 37 deg.C and the gel is treated under the promoted hyaluronic acid- hydrolyzing conditions whereby the solubilized hyaluronic acid has the branched molecular structure and the molecular weight fraction having the branching degree of ≥ 0.5 in the solubilized hyaluronic acid. The resultant gel is, preferably in a sheet, film or crushed form. The gel is obtained by freezing the aqueous solution of ≤ 3.5 pH followed by thawing.

Data supplied from the esp@cenet database - I2

AL2

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2000-239305

(P2000-239305A)

(43)公開日 平成12年9月5日(2000.9.5)

(51)Int.Cl.⁷
C 0 8 B 37/08

識別記号

F I
C 0 8 B 37/08

テマコード*(参考)
Z 4 C 0 9 0

審査請求 未請求 請求項の数5 O L (全 6 頁)

(21)出願番号 特願平11-43287

(22)出願日 平成11年2月22日(1999.2.22)

(71)出願人 000003296

電気化学工業株式会社

東京都千代田区有楽町1丁目4番1号

(72)発明者 池谷 仁志

東京都町田市旭町3丁目5番1号 電気化
学工業株式会社中央研究所内

(72)発明者 新井 一彦

東京都町田市旭町3丁目5番1号 電気化
学工業株式会社中央研究所内

Fターム(参考) 4C090 AA07 AA09 BA67 BD02 BD24
BD31 CA25 DA10 DA22

(54)【発明の名称】 生体吸収性薬物担体

(57)【要約】

【課題】 なんら架橋剤等を使用することなく、安全性及び生体適合性に優れ、それ自体で、あるいは他の生体適合性物質と組み合わせて、注入、吸入、インプラント、及び経口投与等の薬物担体として利用でき、さらに、持続放出システムにも利用できる生体吸収性薬物担体を提供すること。

【解決手段】 中性水溶液に難溶性であるヒアルロン酸単独で形成されたゲルを含有する生体吸収性薬物担体を構成とする。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 中性水溶液に難溶性であるヒアルロン酸単独で形成されたゲルを含有する生体吸収性薬物担体。

【請求項2】 次の(a)、(b)の要件を満たすヒアルロン酸単独で形成されたゲルを含有することを特徴とする生体吸収性薬物担体。(a)中性の37℃の水溶液で12時間での溶解率が50%以下である、(b)ヒアルロン酸の促進酸加水分解条件下でヒアルロン酸ゲルを処理することで可溶化されたヒアルロン酸が分岐構造を有し、該可溶化されたヒアルロン酸中に、分岐度が0.5以上の分子量フラクションを部分的に含む。

【請求項3】 ヒアルロン酸単独で形成されたゲルが、シート状、フィルム状、破碎状、スポンジ状、塊状、繊維状、又はチューブ状からなる群より選択した1種であることを特徴とする請求項2記載の生体吸収性薬物担体。

【請求項4】 中性の37℃の水溶液で12時間での溶解率が50%以下であり、ヒアルロン酸の促進酸加水分解条件下でヒアルロン酸ゲルを処理することで可溶化されたヒアルロン酸中に、分岐度が0.5以上の分子量フラクションを部分的に含むヒアルロン酸ゲルと、ゲル化されていないヒアルロン酸を含む生体吸収性薬物担体。

【請求項5】 シート状、フィルム状、破碎状、スポンジ状、塊状、繊維状、又はチューブ状であるヒアルロン酸単独で形成されたヒアルロン酸ゲルと、ゲル化されていないヒアルロン酸を含む生体吸収性薬物担体。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、中性水溶液に難溶性であるヒアルロン酸単独で形成されたゲルを含有する生体吸収性薬物担体に関する。

【0002】

【従来の技術】一般的に、薬物は経口、静注、筋注等の経路で体内に投与された場合、循環系によって全身に分布し、肝臓あるいは腎臓を経て代謝、排泄される。しかし、薬物の持つ薬理活性を最も有効に活用する為には、薬物を対象部位に適切な濃度で適切な時間作用させることが望ましく、この観点から、薬物に生体吸収性の物質からなる担体を用いて投与剤形を工夫し、薬物の効果をより発揮させる試みがなされてきた。

【0003】このような用途に用いられる生体吸収性の材料としては、生体適合性が高く、用途に応じて様々な形態に成形可能なものが望ましく、乳酸/グリコール酸、コラーゲン、ヒアルロン酸等が用いられている。中でも、ヒアルロン酸は本来、ヒトの体内に存在する物質であり、さらに眼科手術補助剤や関節注入剤等の医薬品として長い使用実績があることから、その生体適合性は充分に確認されていた。しかし、ヒアルロン酸は、体内では速やかに吸収されることから、薬物担体としての利用には制限があった。

【0004】そこで、他の材料と組み合わせる、あるいは、ヒアルロン酸を化学的に修飾して難水溶性とする、試みがなされてきた。例えば、乳酸/グリコール酸共重合体でつくった円筒の中に、エリスロポイエチンとヒアルロン酸の混合物を入れた製剤(日経バイオテック1994.3.28)や、ヒアルロン酸と脂肪族、芳香脂肪族、等との完全または部分エステルからなる薬理活性物質のための担体(特許2569012号)等がある。

【0005】しかし、これらは、ヒアルロン酸それ自体で担体を形成しておらず、前者は実質的に他の成分が担体として機能しており、又、後者は、化学構造が本来のヒアルロン酸とは異なる物質となっている。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】ヒアルロン酸自体が本来持っている優れた生体適合性の特長を最大限生かすために、何ら化学的架橋剤や化学修飾剤を使用することなく、またカチオン性の高分子化合物と複合体を形成することなくヒアルロン酸そのものを難水溶性にする手段はこれまで開発されていなかった。我々は、架橋剤等を使用しないでヒアルロン酸単独からなるヒアルロン酸ゲルを簡便な方法で製造することを初めて見出し(PCT/JP98/03536号)、今回、この難水溶性ヒアルロン酸ゲルの生体吸収性薬物担体への適用の可能性を鋭意検討し、その有用性を見出し本発明を完成するに至った。

【0007】

【課題を解決するための手段】即ち、本発明は、(1)中性水溶液に難溶性であるヒアルロン酸単独で形成されたゲルを含有する生体吸収性薬物担体、(2)次の(a)、(b)の要件を満たすヒアルロン酸単独で形成されたゲルを含有することを特徴とする生体吸収性薬物担体、(a)中性の37℃の水溶液で12時間での溶解率が50%以下である、(b)ヒアルロン酸の促進酸加水分解条件下でヒアルロン酸ゲルを処理することで可溶化されたヒアルロン酸が分岐構造を有し、該可溶化されたヒアルロン酸中に、分岐度が0.5以上の分子量フラクションを部分的に含む、(3)ヒアルロン酸単独で形成されたゲルが、シート状、フィルム状、破碎状、スポンジ状、塊状、繊維状、又はチューブ状からなる群より選択した1種であることを特徴とする(2)記載の生体吸収性薬物担体、(4)中性の37℃の水溶液で12時間での溶解率が50%以下であり、ヒアルロン酸の促進酸加水分解条件下でヒアルロン酸ゲルを処理することで可溶化されたヒアルロン酸中に、分岐度が0.5以上の分子量フラクションを部分的に含むヒアルロン酸ゲルと、ゲル化されていないヒアルロン酸を含む生体吸収性薬物担体、(5)シート状、フィルム状、破碎状、スポンジ状、塊状、繊維状、又はチューブ状であるヒアルロン酸単独で形成されたヒアルロン酸ゲルと、ゲル化されていないヒアルロン酸を含む生体吸収性薬物担体であ

る。

【0008】

【発明の実施の形態】以下、本発明を詳細に説明する。本発明でいうヒアルロン酸ゲルとは、三次元網目構造をもつ高分子及びその膨潤体である。三次元網目構造はヒアルロン酸の架橋構造によって形成されている。

【0009】その一例としては、ヒアルロン酸のpH 3.5以下の水溶液を凍結し、次いで解凍することでシート状、フィルム状、破碎状、スポンジ状、塊状、繊維状、又はチューブ状の中性水溶液に難溶性であるヒアルロン酸ゲルを得ることができる。より具体的には以下に述べる。

【0010】本発明に用いられるヒアルロン酸は、動物組織から抽出したもので、また発酵法で製造したものでその起源を問うことなく使用できる。発酵法で使用する菌株は自然界から分離されるストレプトコッカス属等のヒアルロン酸生産能を有する微生物、又は特開昭63-123392号公報に記載したストレプトコッカス・エクイFM-100（微工研菌寄第9027号）、特開平2-234689号公報に記載したストレプトコッカス・エクイFM-300（微工研菌寄第2319号）のような高収率で安定にヒアルロン酸を生産する変異株が望ましい。上記の変異株を用いて培養、精製されたものが用いられる。

【0011】本発明に用いられるヒアルロン酸の分子量は、約 1×10^5 ～約 1×10^7 ダルトンの範囲内のものが好ましい。また、上記範囲内の分子量をもつのであれば、より高分子量のものから、加水分解処理等をして得たものでも同様に好ましく使用できる。なお、本発明にいうヒアルロン酸は、そのアルカリ金属塩、例えば、ナトリウム、カリウム、リチウムの塩をも包含する概念で使用される。

【0012】本発明でいうヒアルロン酸単独とは、ヒアルロン酸以外に化学的架橋剤や化学的修飾剤等は使用しないことと、カチオン性の高分子と複合体化しないことであり、自己架橋を意味するものである。

【0013】本発明でいうヒアルロン酸ゲルは、ヒアルロン酸の促進酸加水分解反応条件下でヒアルロン酸ゲルを処理することで分解、可溶化することができる。可溶化されたヒアルロン酸が架橋構造を保持している場合、分岐点を有するヒアルロン酸として高分子溶液論的に直鎖状のヒアルロン酸と区別することができる。

【0014】本発明でいうヒアルロン酸の促進酸加水分解反応条件としては、水溶液のpH 1.5、温度60℃が適当である。ヒアルロン酸のグリコシド結合の加水分解による主鎖切断反応が、中性の水溶液中と比較して、酸性やアルカリ性の水溶液中で著しく促進される。更に酸加水分解反応は、反応温度が高い方が促進される。

【0015】本発明ではGPC-MALLS法を用い、GPCで分離された分子量フラクションの分子量と分岐

度をオンラインで連続的に測定した。本発明では、同一溶出体積のフラクションの可溶化されたヒアルロン酸の分子量と対照となる直鎖状ヒアルロン酸の分子量を比較して分岐度を計算する溶出体積法を使って分岐度の測定を行った。分岐度は可溶化されたヒアルロン酸の高分子鎖1コ当たり存在する分岐点の数であり、可溶化されたヒアルロン酸の分子量に対してプロットされる。

【0016】可溶化されたヒアルロン酸は、GPC溶媒で希釈して濃度を調整し、0.2 μ mのメンブランフィルターでろ過した後測定に供した。本発明でいうヒアルロン酸ゲル中に、ヒアルロン酸の促進酸加水分解条件下でも安定に存在する架橋構造がある場合、可溶化されたヒアルロン酸に分岐構造が高分子溶液論的に確認される。本発明でいうヒアルロン酸ゲルの分岐度は、0.5以上である。

【0017】ヒアルロン酸の水溶液のpHを調整するために使用する酸は、pH 3.5以下に調整できる酸であれば、いずれの酸も使用することができる。酸の使用量を低減するために、好ましくは強酸、例えば、塩酸、硝酸、硫酸等を使用することが望ましい。

【0018】ヒアルロン酸の水溶液のpHは、ヒアルロン酸のカルボキシル基が充分な割合でプロトン化するpHに調整する。調整されるpHはヒアルロン酸塩の対イオンの種類、ヒアルロン酸の分子量、水溶液濃度、凍結及び解凍の条件、並びに生成するゲルの強さ等の諸特性により適宜決められるが、本発明では、pH 3.5以下、好ましくは、pH 2.5以下に調整することである。

【0019】凍結、解凍はヒアルロン酸の調整された酸性水溶液を、任意の容器に入れた後、所定の温度で凍結させ、凍結が終わった後、所定の温度で解凍させる操作を少なくとも1回行う。凍結、解凍の温度と時間は、容器の大きさ、水溶液量によりヒアルロン酸の酸性水溶液が凍結、解凍する温度と時間の範囲内で適宜決められるが、一般には、氷点以下の凍結温度、氷点以上の解凍温度が好ましい。凍結、解凍時間を短くできることから、更に好ましくは-5℃以下の凍結温度、5℃以上の解凍温度が選ばれる。また、時間は、その温度で凍結、解凍が終了する時間以上であれば特に制限されない。

【0020】ヒアルロン酸の調整された酸性水溶液を凍結し、次いで解凍する操作の繰り返し回数は、使用するヒアルロン酸の分子量、水溶液濃度、水溶液のpH、凍結及び解凍の温度と時間、並びに生成するゲルの強さ等の諸特性により適宜決められる。通常は1回以上繰り返すことが好ましい。また、凍結、解凍の操作を繰り返すごとに、その凍結、解凍の温度及び時間を変えても構わない。

【0021】ヒアルロン酸の調整された酸性溶液の凍結解凍により得られたヒアルロン酸ゲルは、ヒアルロン酸の酸加水分解を避けるために、酸性に調整するために用

いた酸等の成分を除く必要がある。酸等の成分を除くためには、通常は水性溶媒による洗浄・透析をする。使用する溶媒は、ヒアルロン酸ゲルの機能を損なわないものであれば特に制限はないが、例えば、水、生理食塩水、リン酸緩衝液等が用いられるが、好ましくは、生理食塩水、リン酸緩衝液等が用いられる。

【0022】また、洗浄・透析方法は、特に制限はないが、通常は、バッチ法、汙過法、カラム等に充填して通液する方法等が、また、透析の場合、透析膜、限外ろ過膜による方法等が好適に用いられる。これらの条件は、液量、回数等を含めて、除きたい成分を目標の濃度以下にできる条件であればよく、ヒアルロン酸ゲルの形態や用途により適宜選択することが可能である。

【0023】この洗浄・透析されたヒアルロン酸ゲルは、その使用目的に応じて、溶媒中に浸漬した状態、溶媒を含ませた湿潤状態、風乾、減圧乾燥あるいは凍結乾燥等の処理を経た乾燥状態で生体吸収性薬物担体として供される。

【0024】ヒアルロン酸ゲルの成形加工等の処理は、作製時には、ヒアルロン酸の調整された酸性溶液の凍結時の容器や手法の選択によりシート状、フィルム状、破砕状、スポンジ状、繊維状、又チューブ状の所望の形態のヒアルロン酸ゲルの作製が可能である。例えば、板上にキャスト・イングして凍結することによりフィルム状及びシート状の形態が得られるし、水と混和しない有機溶剤と激しく混合撹拌しながら凍結解凍することにより破砕状の形態が得られる。

【0025】ヒアルロン酸の分子量、濃度、等の条件を変えることで、生体吸収性の異なる種々の難水溶性ヒアルロン酸ゲルが得られる。

【0026】本発明の生体吸収性薬物担体は、それ自体で、あるいは他の生体適合性物質や通常自体公知の医薬用添加剤等とともに製剤化することができ、注入、吸入、インプラント、経口投与等の薬物担体として用いることができる。

【0027】本発明の難水溶性ヒアルロン酸ゲルを含有する生体吸収性薬物担体は、イオン結合等の非共有結合により、薬物の活性を損なうことなく、担体に保持することができる。本来、ヒアルロン酸に親和性のあることが知られている、4級アンモニウム塩（生化学実験講座4糖質の化学（上）p136-）、クロルプロマジン（N. Caram-Lelhametal. Biopoly, 41:765-1997）、各種金属イオン（特開平5-124968号、特表平2-502547号、特表昭63-502670号）等は、本発明の難水溶性ヒアルロン酸ゲルにおいても同様に、水溶液中で容易に保持することができる。さらに、これらの親和性のある物質を介して別の薬物を保持させることもできる。例えば、金属イオンを介して、金属タンパク質を保持できる。

【0028】ヒアルロン酸と親和性のある薬物としては、具体的に、セチルピリジニウムクロライド、セチルトリメチルアンモニウム、塩化ベンゼトニウム、塩化ベンザルコニウム、カルニチン、ブチルスコホラミン、バクタメート、メチルベナクチジウム、イプラトロピウム、カルバコール、エチルピペタナート、チメビジウム、ブトロピウム、アリフィニウム、クロルプロマジン、プロマジン、ドキシセピン、アミトリプチリン等が挙げられる。

【0029】ヒアルロン酸と親和性の無い薬物は、水溶液として、あるいは、ヒアルロン酸や血清アルブミンのような生体適合性物質の水溶液に溶解して、担体中に導入することができ、これを凍結乾燥する等の方法により製剤化することができる。

【0030】本発明は、様々な分野の治療に用いることができ、その適用部位によりシート状、フィルム状、破砕状、スポンジ状、塊状、繊維状、又はチューブ状からなる群より選択できる。経粘膜投与の場合は、シート状、フィルム状、スポンジ状が局所への貼付に好適であり、経肺投与の場合は破砕状で乾燥したサイズが1~3 μ mのものが咳の原因となる事もなく好適である。

【0031】

【実施例】以下、本発明を実施例により具体的に示すが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

【0032】調製例1：難水溶性ヒアルロン酸ゲルの作製

分子量 2×10^6 ダルトンのヒアルロン酸を蒸留水に溶解し、1%の溶液を調製した。この水溶液に1N硝酸を添加しpH1.5に調整した後、ヒアルロン酸25mg分をバイアル瓶に入れ、-20℃に設定した冷凍庫で凍結した。20時間後に取り出し25℃で2時間解凍する操作を3回繰り返して難水溶性ゲルを得た。次に、このゲルをpH7の25mMリン酸緩衝生理食塩水100mlに24時間浸漬中和した後、蒸留水で十分にろ過洗浄し、塊状の難水溶性ゲルを得た。

【0033】実施例1：難水溶性ヒアルロン酸ゲルの溶解性試験

生理食塩水に50mM濃度でリン酸緩衝成分を加え、pH7のリン酸緩衝生理食塩水を調製した。調製例1で作製した難水溶性ゲルを50mlのリン酸緩衝生理食塩水に浸漬し緩やかに撹拌した。37℃でリン酸緩衝生理食塩水中に溶出するヒアルロン酸の割合を、リン酸緩衝生理食塩水中のヒアルロン酸濃度から求めた。

【0034】ヒアルロン酸濃度の測定

リン酸緩衝生理食塩水中のヒアルロン酸濃度は、GPCを使って、示差屈折率検出器のピーク面積から求めた。

【0035】その結果、調製例1で得られたヒアルロン酸ゲルの溶解率は、12時間経過後では、3%であり、24時間経過後では、5%であり、24時間経過しても

85%のヒアルロン酸ゲルが残存していた。よって、調製例1で得られたヒアルロン酸ゲルが中性水溶液に難溶性であることが示唆される。

【0036】実施例2：難水溶性ヒアルロン酸ゲルの分岐度測定

調製例1で得られた難水溶性ヒアルロン酸ゲルを、pH 1.5の塩酸水溶液15mlに浸漬し、60℃、6時間の加水分解を行った。ゲルは加水分解により可溶化され、これをGPC溶媒で2倍に希釈して濃度を0.05重量%に調製し、0.2μmのメンブレンフィルターでろ過した後、0.1ml注入してGPC-MALLSの測定を行った結果、分岐度0.5以上であった。

【0037】実施例3：生体吸収性試験

マウス(ICR♀8週令)の腹腔内に開腹手術により調製例1の難水溶性ゲルあるいは比較として、1ml 1%ヒアルロン酸溶液を入れた。術後2、4、8日後に開腹し、残存するゲルを回収し、腹腔内に生理食塩水2mlを注入し、よく攪拌し液を回収した。このゲルと液をアルカリ処理(0.1N NaOH、2h)した後、中和し、ゲルろ過(ShodexOHpakKB806)によりヒアルロン酸濃度を測定し、残存率を算出した。その結果を表1に示す。

【0038】

【表1】

試料	残存率(%)		
	2日後	4日後	8日後
調製例1で作製した ヒアルロン酸ゲル	56	33	0
ヒアルロン酸溶液	0.3	0	0

【0039】表1より、調製例1で得られたヒアルロン酸ゲルは、4日後で33%残存していたのに対し、ヒアルロン酸溶液は0%であり、本発明のヒアルロン酸ゲルは、生体内滞留時間が長いことが示唆される。即ち、ヒアルロン酸溶液と比較して、生体内での分解吸収速度が遅く、薬物担体として有用な性質を有していることが示唆される。

【0040】実施例4：薬物保持試験

調製例1の難水溶性ゲルを各種薬物の25mg/5ml水溶液に入れ、25℃24時間静置後のゲル周囲の水溶液中の各薬物濃度を吸光度により測定し、ゲルへの薬物の保持率を算出した。その結果を表2に示す。

【0041】

【表2】

薬物	薬物保持率(%)
塩化ベンザルコニウム	95
プロマジン	98
カルニチン	98

【0042】表2より、いずれの薬物もヒアルロン酸ゲルへの保持率は95%以上と高かった。

【0043】実施例5：薬物放出試験

実施例2において薬物を保持したゲルを透析チューブに入れ、500mlのリン酸緩衝生理食塩水pH7.4に対して37℃で透析した。経時的に透析外液の吸光度を測定し、ゲルからの薬物の放出率を算出した。その結果を表3に示す。

【0044】

【表3】

薬物	薬物放出率 (%)				
	1 hr	2 hrs	4 hrs	8 hrs	24 hrs
塩化ベンザルコニウム	7	16	33	61	96
プロマジン	15	28	44	63	91
カルニチン	30	49	70	90	98

【0045】表3より、各薬物ともいずれも、持続的に放出されていることがわかる。即ち、持続放出システムにも利用できることが示唆される。

【0046】

【発明の効果】本発明により、ヒアルロン酸単独で形成された難水溶性のヒアルロン酸ゲルを含有する生体吸収

性薬物担体を提供することができる。かかる本発明の生体吸収性薬物担体は、架橋剤等を使用していないため、安全性及び生体適合性に優れ、それ自体で、あるいは他の生体適合性物質と組み合わせて、注入、吸入、インプラント、及び経口投与等の薬物担体として利用でき、さらに、持続放出システムにも利用できる効果を奏する。